



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Andrej Biškup

Student 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

IPERITI – OD KEMIJSKOG ORUŽJA DO KEMOTERAPEUTIKA

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za organsku kemiju

Mentor rada: doc.dr.sc. Đani Škalamera

Zagreb, 2018.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

15. svibnja 2018.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

21. rujna 2018.

Mentor rada: doc.dr.sc. Đani Škalamera

Potpis:

Sadržaj

§ SAŽETAK.....	VII
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME	3
2.1. Kemijska struktura i reaktivnost sumporovih i dušikovih iperita	3
2.1.1. <i>Sinteza sumporovih iperita – povijesni pregled.....</i>	<i>3</i>
2.1.2. <i>Sinteza dušikovih iperita – povijesni pregled.....</i>	<i>4</i>
2.1.3. <i>Aziridini.....</i>	<i>5</i>
2.1.4. <i>Sinteza i stabilnost aziridina</i>	<i>6</i>
2.1.5. <i>Reaktivnost iperitâ</i>	<i>8</i>
2.2. Reakcije iperitâ s nukleofilima	10
2.2.1. <i>Reakcije s jednostavnim nukleofilima</i>	<i>11</i>
2.2.2. <i>Reakcije s nukleofilima u biološkim sustavima</i>	<i>13</i>
2.3. Biološka aktivnost iperitâ	17
2.3.1. <i>Sumporovi iperiti kao bojni otrovi</i>	<i>17</i>
2.3.2. <i>Dušikovi iperiti kao kemoterapeutici</i>	<i>19</i>
2.4. Kliničke primjene dušikovih iperita.....	20
2.5. Zaključak	24
§ 3. LITERATURNI IZVORI.....	XXV

§ Sažetak

Iperiti su kemijski spojevi koji u svojoj strukturi sadrže nukleofilni centar – sumporov ili dušikov atom te elektrofilni centar (ili više njih) – klormetilne skupine vezane preko jedne ili više metilenskih jedinica za heteroatom (S ili N). Specifična struktura ovih spojeva, u kojoj u neposrednoj blizini unutar molekule postoji nukleofilno i elektrofilno mjesto, ima velik utjecaj na reaktivnost ovih spojeva. Uslijed toga, ovi spojevi posjeduju biološku aktivnost. Tako su se sumporovi iperiti pokazali učinkovitim kemijskim oružjem, dok su dušikovi iperiti pokazali dobra svojstva kao kemoterapeutici.

U prikazu teme najprije je dan povijesni pregled sinteze sumporovih i dušikovih iperita. Zatim su obrađeni aziridini, kemijski spojevi čija je reaktivnost važna za razumijevanje reaktivnosti iperita. Nadalje, prikazane su odabrane reakcije iperita s jednostavnijim nukleofilima kao što su H_2O , RNH_2 , R_2NH te oksidacijskim sredstvima, npr. HNO_3 i KMnO_4 . Zatim su obrađene reakcije iperita s nukleofilima u biološkim sustavima (baze DNA) te detaljno obrazložen mehanizam alkilacije iperita s molekulom DNA, odnosno s bazama DNA. U sljedećem poglavlju opisani su simptomi do kojih dolazi uslijed trovanja sumporovim analogom kao bojnim otrovom i, s druge strane, način na koji su se dušikovi iperiti počeli koristiti kao jedna od mogućnosti u liječenju raka, tj. kao kemoterapeutici. U posljednjem, no svakako ne i manje važnom, poglavlju prikazani su dušikovi iperiti kao vrsta terapije u liječenju različitih karcinoma.

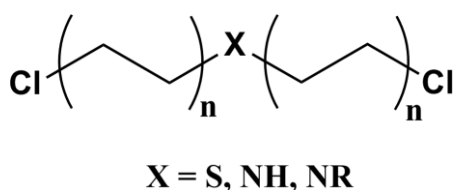
§ 1. UVOD

Općenito se pod nazivom „iperit“ smatra sumporov analog ove klase spojeva. Nakon otkrića štetnosti po zdravlje ovih spojeva početkom 20. stoljeća, primjenjivali su se kao vrlo učinkovito kemijsko oružje. Intenzivna primjena sumporovih iperita započela je tijekom Prvog Svjetskog rata prilikom napada Njemačke flote na Englesku vojsku u blizini Belgijskog gradića Ypresa po kojem su iperiti dobili naziv. Daljnjim istraživanjem iperita uočeno je njihovo potencijalno antitumorsko djelovanje. U istraživanjima koja su uslijedila, sintetiziran je analog iperita koji se razlikuje od sumpornog u središnjoj skupini– dušikov iperit. Sredinom 20. stoljeća, dušikovi iperiti počeli su se koristiti u kemoterapijama. Nakon nekoliko uspješnih tretmana dušikovim iperitom na osobama oboljenim od karcinoma, započela je velika revolucija u istraživanju novih iperitnih struktura kao mogućih antitumorskih lijekova. Kemija iperita najvećim dijelom određena je međuproduktima koji sadrže vrlo reaktivan tročlani prsten, koji sadrži jedan heteroatom sumpora (sumporovi iperiti), odnosno dušika (dušikovi iperiti). Prilikom stupanja u reakciju, primjerice s kožom (sumporovi iperiti), ili pak tijekom liječenja kemoterapijom (dušikovi iperiti), tročlani prstenovi vrlo žustro reagiraju s bazama DNA, pri čemu izazivaju njezino oštećenje. Kemija sumporovih i dušikovih iperita u suštini je vrlo slična, no primjena ovih spojeva u potpunosti je različita.

§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME

2.1. Kemijska struktura i reaktivnost sumporovih i dušikovih iperita

Iperiti su kemijski spojevi čija se struktura općenito može prikazati strukturnom formulom na slici 1, a razlikuju se po središnjem atomu koji može biti atom sumpora (sumporovi iperiti) ili atom dušika (dušikovi iperiti).

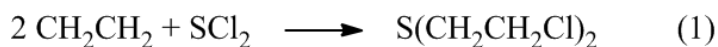


Slika 1. Opća strukturna formula iperitâ

2.1.1. Sinteza sumporovih iperita – povijesni pregled

Zanimljiva je činjenica kako su sumporovi iperiti prvi put sintetizirani gotovo 100 godina prije svoje prve upotrebe 1917. godine.

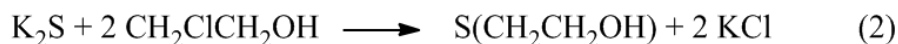
Belgijski kemičar César-Mansuète Despretz (1798.–1863.) opisao je 1822. godine dobivanje S-iperita reakcijom sumporovog diklorida i etilena:



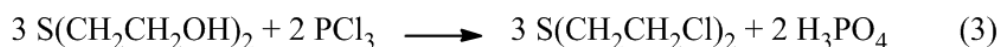
Dobiveni produkt opisao je smrdljivom i viskoznom tekućinom koja ne gori, ali nije opisao i iritacijsko djelovanje na koži.

Četrdesetak godina kasnije, 1860. godine, njemački kemičar Albert Niemann (1834.-1861.), poznat po izolaciji kokaina iz lišća Peruanske koke, proveo je reakciju etilena i “smeđeg” sumporovog klorida (smjesa sumporovog monoklorida i sumporovog diklorida). U opisu uljastog produkta (iperita) ističe njegovu izrazitu opasnost, koja nekoliko sati nakon doticaja s kožom stvara plikove koje je teško liječiti.

Njemački kemičar Victor Meyer (1848.-1897.), 1886. godine objavljuje članak u kojem predstavlja novi način sinteze čišćeg sumporovog iperita reakcijom vodene otopine kalijeve sulfida i etilen-klorohidrina:



Nastali tiodiglikol prevodi se u sumporov iperit kloriranjem uz pomoć fosforovog(III) klorida:



Unaprijeđenje sinteze donosi Hans T. Clarke (1887.–1972.), koji drugi korak Meyerove reakcije (3) zamjenjuje zagrijavanjem otopine tiodiglikola u klorovodičnoj kiselini. Opisana reakcija je brža, isplativija i provodi se uz veće iskorištenje od Meyerove reakcije (3). Nadalje, Clarke također opaža otrovno djelovanje iperita.^{1,2}

Čisti bis(2-kloretil)-sulfid, najjednostavniji analog iz klase sumporovih iperita, bezbojna je uljasta tekućina gotovo netopljiva u vodi (0,07 % pri 10°C), temperature vrelišta 217°C (pri atmosferskom tlaku) te gustoće 1,2686 g/cm³ pri 25°C.²

2.1.2. Sinteza dušikovih iperita – povijesni pregled

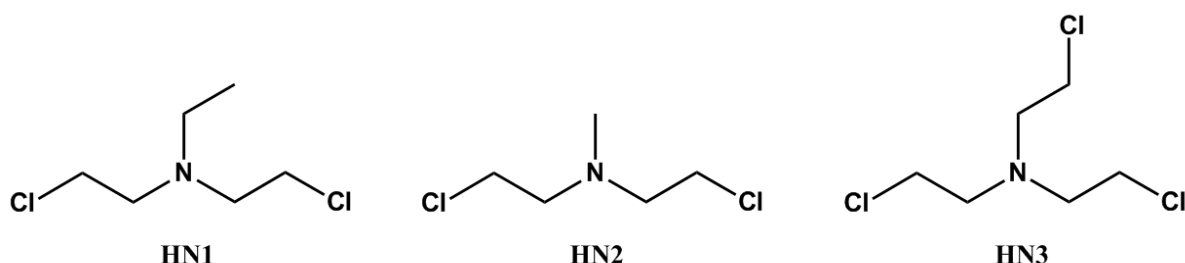
Potaknuti činjenicom velike učinkovitosti kemijskog oružja u ratovanju tijekom Prvog svjetskog rata, tadašnje vodeće sile svijeta velika sredstva ulažu u pronalazak boljih i efikasnijih kemijskih oružja. Početkom Drugog svjetskog rata, u narednih nekoliko godina sintetizirano je nekoliko tisuća spojeva kao potencijalnih toksičnih tvari za korištenje u ratne svrhe. Istraživanje toksičnosti novopripremljenih spojeva dovelo je do boljeg razumijevanja utjecaja strukture na toksičnost te mehanizma djelovanja toksičnih tvari u ljudskom organizmu. Jedna od najistraživanijih klasa spojeva bili su dušikovi iperiti.

Tercijarni 2,2'-diklorodialkilamini (dušikovi iperiti) posjeduju toksična svojstva slična sumporovim iperitima. Također je otkriveno da pri dužem izlaganju vodenoj otopini postaju neurotoksični (selektivni inhibitori kolinesteraze), stoga su korišteni u ratne svrhe kao efektivni zagađivači vode. Nakon ispuštanja u okoliš, sumporovi iperiti se tamo zadržavaju oko tjedan dana.³ Sinteza dušikovih iperita temeljila se na kloriranju tercijarnih

2,2'-dihidroksidialkilamina odgovarajućim klorirajućim agensom, s ili bez prisutstva otapala. Kao klorirajuća sredstva korišteni su fosforov triklorid (PCl_3), sulfuril-klorid (SO_2Cl_2) i sumporov monoklorid (S_2Cl_2), no najbolji rezultati pokazali su se uz upotrebu tionil-klorida (SOCl_2). Općenita jednažba kemijske reakcije dobivanja dušikovih iperita može se prikazati jednažbom:



Prvi pripremljeni spoj iz klase dušikovih iperita bio je 2,2',2''-triklortrietilamin (sl. 2, **HN3**).⁴



Slika 2. Strkturne formule odabranih analoga dušikovih iperita
(HN1 = *N*-etil-*N*-bis(2-kloretil)amin, HN2 = *N*-metil-*N*-bis(2-kloretil)amin,
HN3 = *N*-tris(2-kloretil)amin)

2.1.3. Aziridini

Za razmatranje reaktivnosti iperita, važno je proučiti kemiju aziridina, zbog toga što je upravo on međuprodukt u reakcijama dušikovih iperita. Aziridin (etilenimin) je tročlani prsten koji sadrži amino skupinu, tj. to je dušikov analog epoksida (slika 3). Pri standardnim uvjetima je bezbojna tekućina (t.v. 57 °C), topljiv je u vodi.⁵

Nukleofilna supstitucija kakva postoji kod reakcija iperita je zapravo nukleofilna supstitucija potpomognuta participirajućom skupinom koja se nalazi prostorno u blizini (najčešće na susjednom C atomu do reakcijskog centra). Skupine koje mogu participirati su npr. sulfidi, amini, esteri, eteri, karboksilati. Navedenim skupinama je zajedničko postojanje heteroatoma bogatog elektronima, koji intramolekulskim nukleofilnim napadom generira reaktivni ciklički

međuprodukat (npr. aziridinijev ion), presudan za reaktivnost ovih spojeva. Upravo takav mehanizam omogućuje znatno brže reakcije alkilacije.^{6a}



Slika 3. Strukturna formula aziridina

2.1.4. Sinteza i stabilnost aziridina

Jedan od najvažnijih načina stvaranja heterocikličkih spojeva je reakcijama zatvaranja prstena. U takvoj metodi, heteroatom djeluje kao nukleofil u reakcijama adicije, odnosno supstitucije.^{6b}

Aziridin je prvi puta sintetiziran 1888. godine iz 2-kloroetilamina u baznim uvjetima (shema 1).



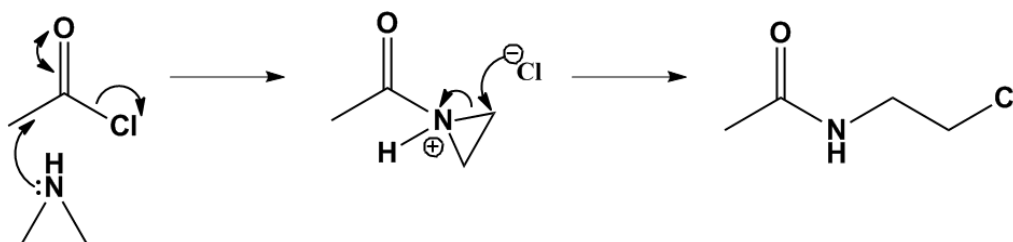
Shema 1. Sinteza aziridina^{6c}

Nastajanje četveročlanih prstenova je jako sporo zbog veće udaljenosti nukleofilnog i elektrofilnog mjesta u prekursoru, tj. savladavanja energetske barijere, dok je kod tročlanih prstenova ta udaljenost znatno manja pa je posljedično nastajanje tročlanih prstenova znatno brže. Brzina nastajanja tročlanih prstenova prividno je manja zbog velike napetosti uslijed koje dolazi do uspostavljanja ravnoteže s otvorenim oblikom.^{6b}

Tročlani prsten aziridina vrlo je reaktivan jer se otvaranjem prstena takvog tipa oslobađa energija napetosti, što je energetski povoljno. Peteročlani, šesteročlani i višočlani

prstenovi imaju manju napetost pa do otvaranja takvih prstenova dolazi rijetko ili uopće ne dolazi.

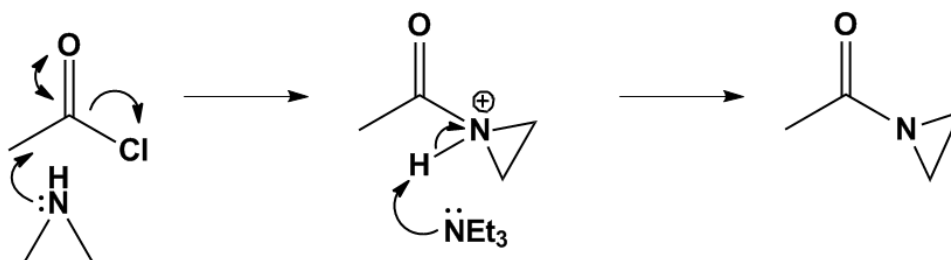
Primjer reakcije u kojoj dolazi do otvaranja aziridinskog prstena je aciliranje aziridina s acetil kloridom (shema 2).



Shema 2. Aciliranje aziridina^{6b}

Dušik aziridina nukleofilno napada na reaktivni acetil-klorid, ali dobiveni amid nije stabilan te podliježe reakciji s kloridom, koji je inače slab nukleofil, što ilustrira lakoću otvaranja izuzetno napetog prstena aziridina. Napetost prstena je zapravo pokretačka sila ove reakcije. Iskorištenje reakcije je 95%.^{6b}

Osim steričke napetosti, kao izuzetno bitnog svojstva zbog kojeg dolazi do otvaranja prstena aziridina, sljedeći znatno važan faktor je pozitivan naboj na dušiku, tj. kad je dušik kvaterni, što ga čini dobrom izlazećom skupinom. Naime, ukoliko se reakcija sa sheme 8 odvija u bazičnom mediju, uklanjanje protona s dušika pomoću baze rezultira nastajanjem stabilnog *N*-acetilaziridina (shema 3).^{6b}

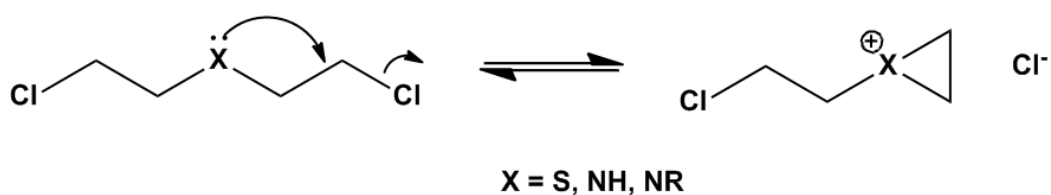


Shema 3. Alkilacija aziridina u bazičnom mediju^{6b}

Prikazane reakcije u načelu vrijede i za spojeve koji umjesto atoma dušika imaju atom sumpora ili kisika.^{6b}

2.1.5. Reaktivnost iperitâ

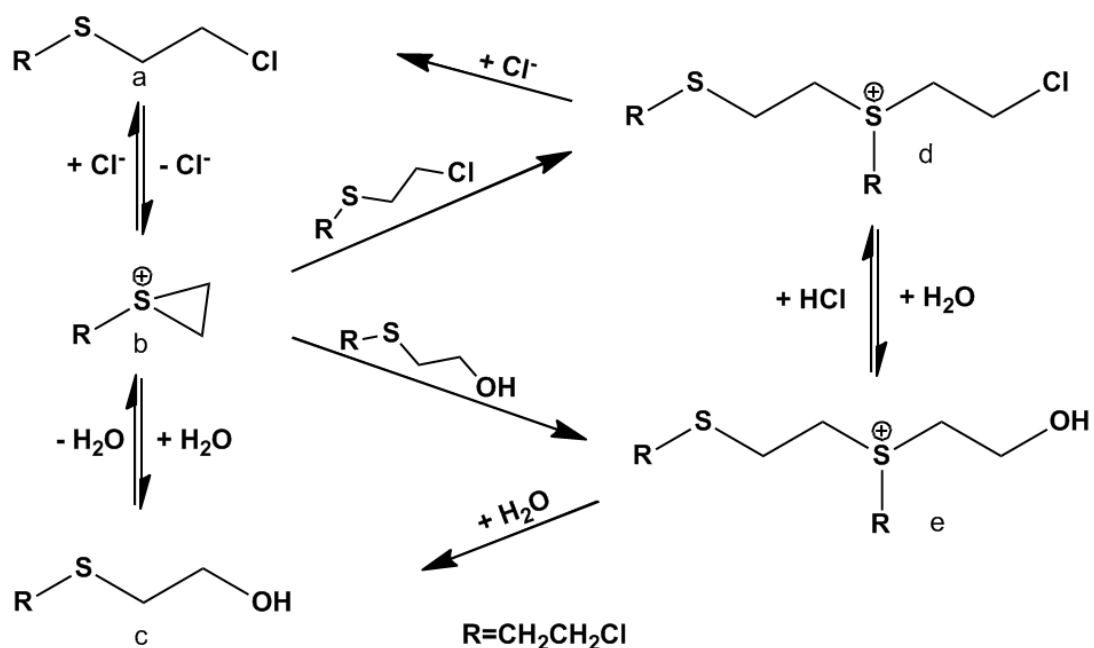
Sposobnost stvaranja reaktivnih tročlanih heterocikličkih kationskih vrsta, kao što su sulfonijev ion i aziridinijev ion (shema 4), zajednička je karakteristika iperitâ, što se direktno odražava na mehanizam njihova djelovanja te karakterizira njihova kemijska svojstva.



Shema 4. Nastanak tročlanih cikličkih kationa uslijed intramolekularnog nukleofilnog napada⁷

Zbog nestabilnosti takvih kationskih vrsta, što je diskutirano kod prikaza kemije aziridina §2.1.4, iperiti lako podliježu hidrolizi, polimerizaciji i reakciji s nukleofilima, što je i uzrok njihovih toksičnih svojstava.⁷

Reaktivnost sumporovog iperita proizlazi iz mogućnosti intramolekulskog nukleofilnog napada sumpora na ugljikov atom s vezanim klorom. Sumpor je odličan nukleofil, a klorid relativno dobra izlazeća skupina. Rezultat ovakvog nukleofilnog napada je stvaranje iznimno reaktivnog tročlanog cikličkog sulfonijevog kationa (sh.5,b). Takav reaktivan međuprodukt bez problema ulazi u daljnje reakcije napadom različitih nukleofila, kao što je npr. voda, ili pak reagira s drugom molekulom sumporova iperita, pri čemu dolazi do čitavog niza reakcija (shema 5). Razlog ovakve visoke reaktivnosti je otvaranje tročlanog prstena, pri čemu se oslobađa energija napetosti.⁷

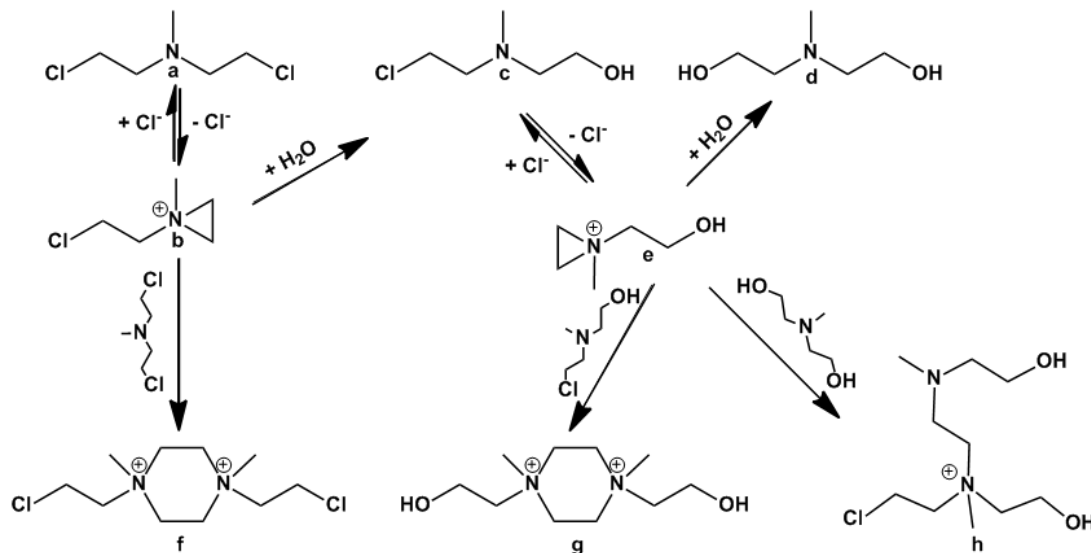


Shema 5. Mehanizam hidrolize i polimerizacije sumporovog iperita⁷

Sulfonijev ion podložan je hidrolizi pri čemu nastaje alkohol (sh. 5,c) što je, osim stvaranja samog sulfonijevog iona, također ravnotežan proces. Biološki znatno važniji procesi su reakcije nestabilnog iona s nukleofilima prisutnim u stanici, primjerice s dušikom iz baza DNA. Moguća je i reakcija sa tioeterskim nukleofilom (početnim iperitom (sh. 5,a) ili njegovim hidroliziranim derivatom (sh. 5,c), dajući dimerizirane produkte (sh. 5,d i e), koji također mogu reagirati s biološki važnim nukleofilima.⁷

Dušikovi iperiti pokazuju sličnosti u strukturnim, toksikološkim pa tako i mehanističkim aspektima sa sumpornim analogima ovih spojeva. U svrhu proučavanja mehanizma djelovanja dušikovih iperita, provedena su mjerenja kinetike reakcije u različitim uvjetima pri kojima dolazi do hidrolize (puferirane i nepuferirane otopine, otopine u vodi i acetonu,...). Prvi korak u reakcijskom mehanizmu dušikovih iperita je, kao i kod sumporovih analoga, nastanak iznimno reaktivnog tročlanog cikličkog međuprodukta (sh. 6,b). Sljedeći korak je prevođenje nastalog aziridinijevog iona, nešto sporijim reakcijama, do monohidroksi i dihidroksi produkata (sh. 6,c i d). Produkti c i d potječu od molekula koje sadrže aziridinijev ion i različitu terminalnu skupinu, bila to hidroksilna (sh. 6,e) ili kloridna (sh. 6,b). Nadalje, molekula dušikovog iperita može dimerizirati stvarajući 1,4-dialkilpiperazinijeve ione (sh. 6,f i g) ili izdužene ravnolančane polimere (sh. 6,h). Specifičnost (duljina alkilnog

lanca) nastalog derivata iperita ovisi o stupnju hidrolize i dimerizacije, odnosno polimerizacije.⁷



Shema 6. Mehanizam hidrolize i dimerizacije mekloretamina⁷

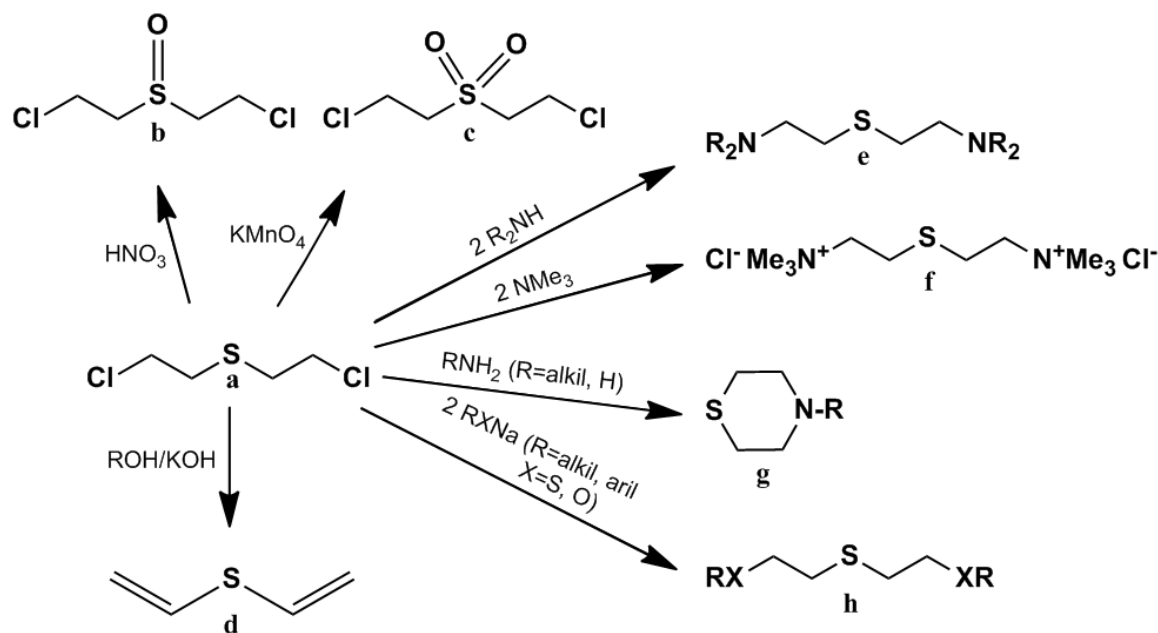
Produkti nastali dimerizacijom mogu postojati kao *cis* i *trans* izomeri. Konkretno, u slučaju mekloretamina, znatan je udio *cis* produkta (sh. 6,f), a udio *trans* produkta je vrlo malen. Duljina alkilnog lanca ne utječe na stupanj hidrolize, no ima značajan utjecaj na prinos dimera (sh. 6,f). Nadalje, povećanjem duljine alkilnog lanca smanjuje se prinos dimera što je posljedica steričkih smetnji. Što se tiče otapala, povećanje stupnja dimerizacije javlja se u polarnim otapalima kao što su metanol i DMSO (dimetil-sulfoksid) pa su takve otopine prilično nestabilne. U nepolarnim otapalima, kao što su eter, CCl₄ i dioksan, monomerni oblik stabilan je u periodu od nekoliko dana. Stupanj hidrolize u puferiranim otopinama veći je u usporedbi s nepuferiranim otopinama. Pri višim koncentracijama iperita ili u otopinama gdje je otapalo aceton-voda povećava se omjer dimerizacije/hidrolize.⁷

2.2. Reakcije iperitâ s nukleofilima

Poznato je kako su dušikovi i sumporovi iperiti vrlo reaktivni u vodi, dok su kisikovi analozi iperita znatno stabilniji. Kemijska svojstva iperita determinirana su središnjim atomom sumpora, odnosno dušika te terminalnim kloridnim skupinama.⁷

2.2.1. Reakcije s jednostavnim nukleofilima

Sumporovi iperiti podliježu mnogim reakcijama od kojih su neke prikazane na shemi 7. Djelovanjem oksidacijskog sredstva kao što je dušična kiselina (HNO_3) ili kalijev permanganat (KMnO_4), oksidiraju se do sulfoksida (sh. 7, **b**) odnosno sulfona (sh. 7, **c**).

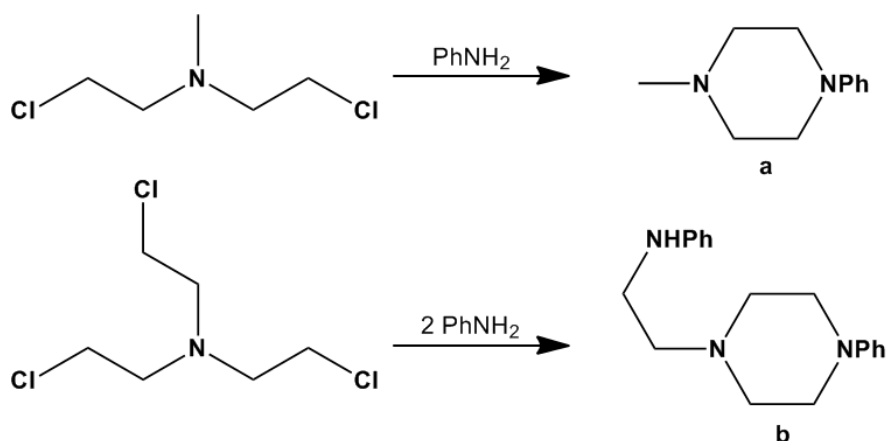


Shema 7. Odabrane reakcije sumporovog iperita⁷

U DMSO, blagom oksidacijskom reagensu koji se često koristi u organskoj sintezi, sumporov iperit polako oksidira do sulfoksida kroz period od nekoliko tjedana. Takva mogućnost selektivne oksidacije sumporova iperita omogućila je razvoj metoda za kemijsku detoksifikaciju. U prisutstvu smjese alkohola i kalijeve lužine, sumporni iperiti podliježu dehidrohalogenaciji, pri čemu kao produkti nastaju alkeni (sh. 7, **d**). U reakcijama s različitim aminima daju produkte nastale nukleofilnom supstitucijom (sh. 7, **e-g**). Konkretno, u reakciji sa sekundarnim aminom kao produkt nastaje bis(β -dialkilaminoetil)sulfid (sh. 7, **e**), dok reakcijom s tercijarnim aminom (trimetilamin) nastaju kloridne soli kvaternih amina (sh. 7, **f**). Nadalje, primarni amini mogu ostvariti nukleofilni napad na oba β -ugljikova atoma iste molekule iperita, pri čemu kao produkt nastaje šesteročlani tiazinski prsten (sh. 7, **g**). Valja napomenuti da se navedene reakcije, osim tercijarnih amina, provode uz bazu kao što je natrijev karbonat (Na_2CO_3), zbog uklanjanja nastale korovodične kiseline (HCl), što ubrzava

reakciju te se na taj način ostvaruje veći prinos reakcije. Disupstituirani produkt (sh. 7,**h**) nastaje u reakciji s O ili S nukleofilima kao što su fenolati, tiofenati i merkaptidi.⁷

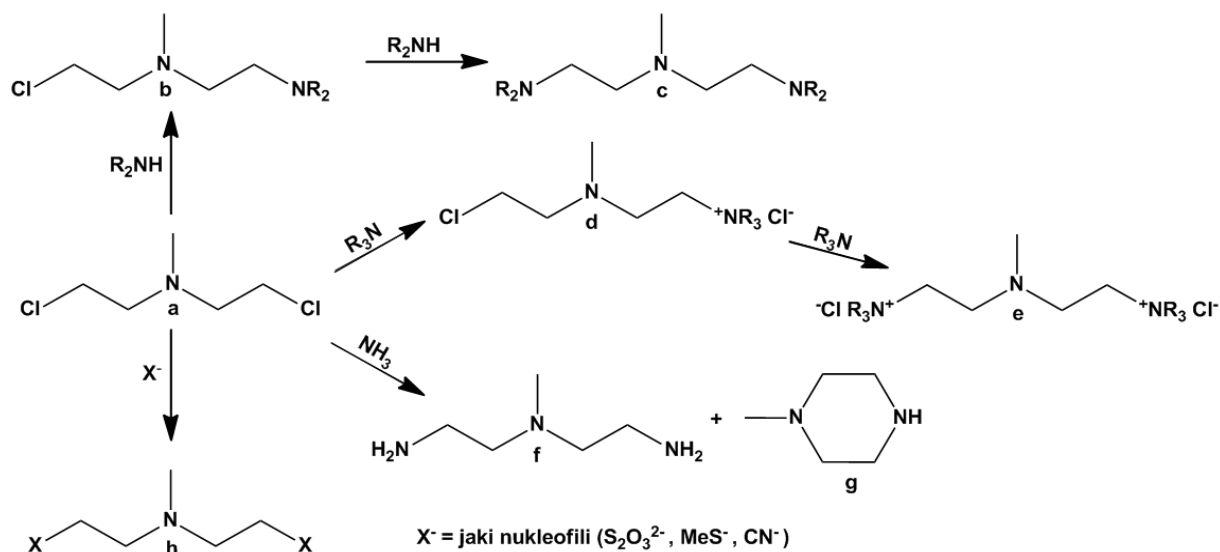
Dušikovi iperiti imaju slične karakteristike u reakcijama s različitim nukleofilima kao i sumporovi iperiti. Jedna od razlika među njima je manja toksičnost dušikova iperita. U reakcijama dušikovitih iperita i primarnih amina nastaju ciklički produkti piperazina (sh. 8). Takvi produkti rezultat su dva nukleofilna napada amino-skupine iz reagensa (PhNH_2). Zbog stabilnosti i lakšeg/sigurnijeg rukovanja takvim reagensima, iperiti se koriste u obliku soli klorovodične kiseline (hidrokloridi). U reakciji klorovodične soli mekloretramina i anilina u vrućem metanolu nastaje 1-metil-4-fenilpiperazin (sh. 8,**a**).⁷



Shema 8. Nukleofilne supstitucije mekloretramina i 2,2,2"-triklorotrietilamina s anilinom⁷

U istoj reakciji s 2,2,2"-triklorotrietilaminom, koji posjeduje tri „ruke“ podložne nukleofilnom napadu, također nastaje prsten, ali s dodatnom anilinoetilnom skupinom na prvom dušikovom atomu, dajući tako 1-metil-4-fenilpiperazin (sh. 8,**b**). Reakcije na shemi 8 predstavljaju jednu od važnijih metoda pripreme 1,4-disupstituiranih derivata piperazina.

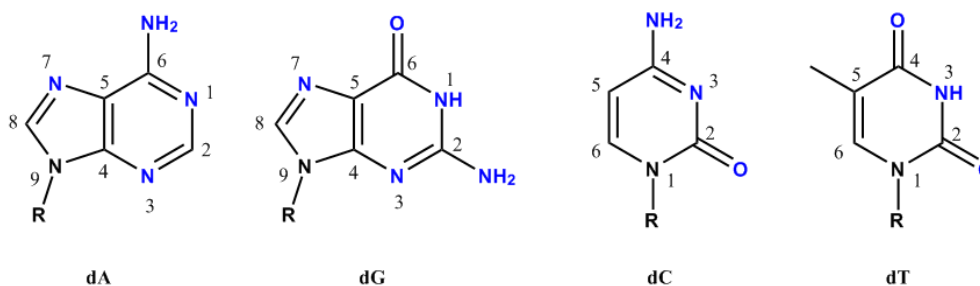
U reakciji dušikovitih iperita sa sekundarnim i tercijarnim aminima nastaju mono- i di-supstituirani produkti, nastali zamjenom jednog ili dva atoma klora iperita (sh. 9**b,c,d,e**).

Shema 9. Nukleofilne supstitucije mekloretamina s aminima⁷

Ne zanemarivu ulogu u reaktivnosti alifatskih amina imaju alkilne skupine. Ukoliko su takve skupine duže i veće, usporavaju reakciju zbog steričkih utjecaja. Za razliku od alifatskih amina, ciklički amini pokazuju povećanu reaktivnost i malo povećanu bazičnost, što je posljedica smanjenja steričkih efekata zbog prstena koji je “povučen natrag” pa je nepodijeljeni elektronski par na dušiku više otkriven. U reakcijama s jakim nukleofilima, nastaju disupstituirani produkti. Ukoliko dušikov iperit reagira sa suviškom amonijaka, produkti su disupstituirani (sh. 9,f) i ciklički (sh. 9,g). Takvi produkti nastaju u prisutstvu molekula koje sadrže višestruka nukleofilna mjesta.⁷

2.2.2. Reakcije s nukleofilima u biološkim sustavima

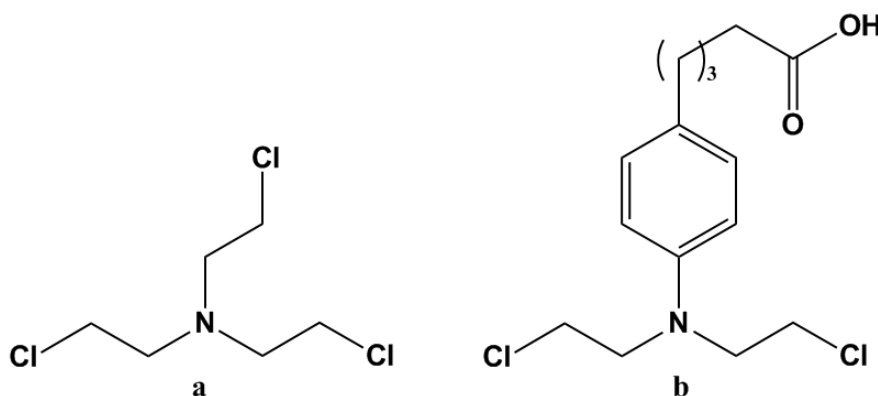
Svakako najvažniji nukleofil u biološkim sustavima, s kojim reagiraju iperiti, je molekula DNA. Gotovo svaki atom dušika i kisika u bazi DNA potencijalno je nukleofilno mjesto za alkilaciju pri odgovarajućim uvjetima (slika 4).⁸



Slika 4. Alkilacijska mjesta purinskih (**dA** i **dG**) i pirimidinskih (**dC** i **dT**) nukleobaza.

(R=2'deoksiriboza)⁸

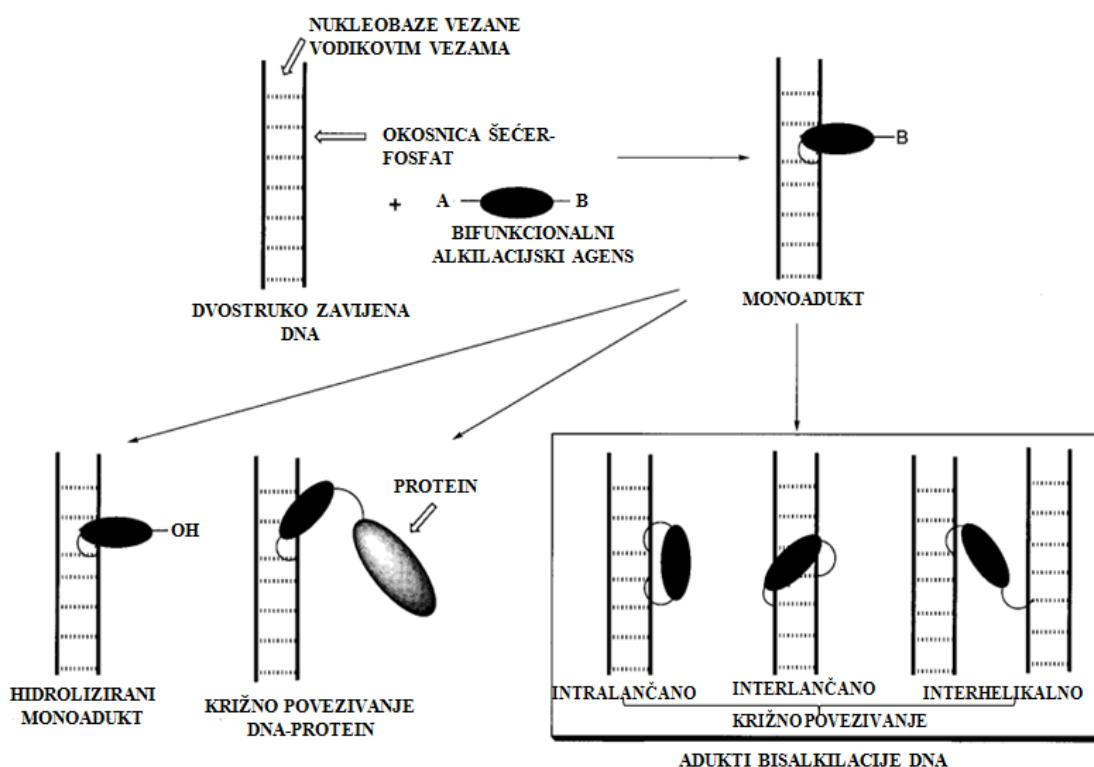
Visok stupanj citotoksičnosti iperita temelji se na mogućnosti stvaranja interlančanih križno povezanih DNA (engl. *DNA interstrand cross-links*) preko molekule iperita. Tako umreženoj DNA inhibirana je replikacija. Mekloretoamin i klorambucil (slika 5) jedni su od najčešće upotrebljivanih kemoterapeutika u liječenju raka posljednjih četrdesetak godina.



Slika 5. Strukturna formula mekloretoamina (**a**) i klorambucila (**b**)

Valja spomenuti da je hrvatski nobelovac Vladimir Prelog prvi sintetizirao mekloretoamin.⁹

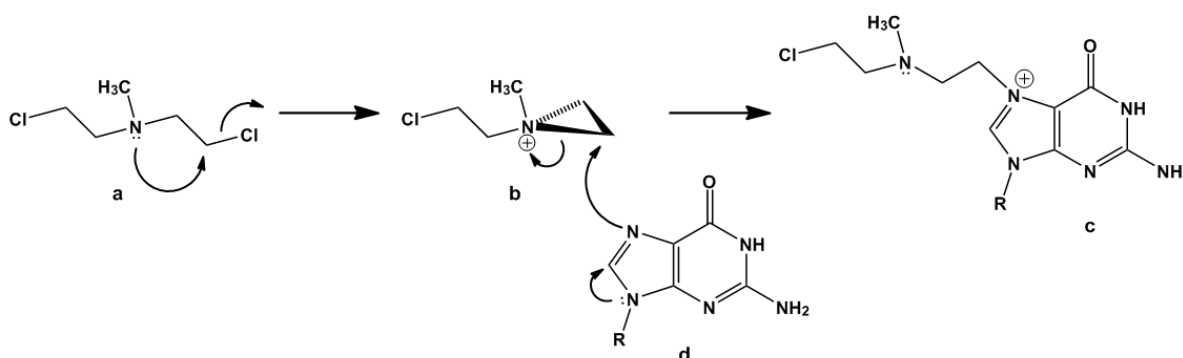
Mehanizam alkiliranja DNA N-iperitom objašnjen je na temelju izolacije produkta nastalog reakcijom mekloretoamina i monomera GMP-a (gvanozin monofosfat). Navedena reakcija praćena je ranijim eksperimentima koji uključuju identifikaciju produkta nastalog reakcijom mekloretoamina i kvašćeve RNA. Produkt navedene reakcije objašnjen je kao rezultat interlančane bisalkilacije (engl. *interstrand bisalkylation*) na sekvenci 5'GpC^{3'} (slika 6).



Slika 6. Mehanizam funkcionalizacije DNA reagensima za križno povezivanje. A i B predstavljaju elektrofilne ostatke unutar reagensa za križno povezivanje.¹⁰

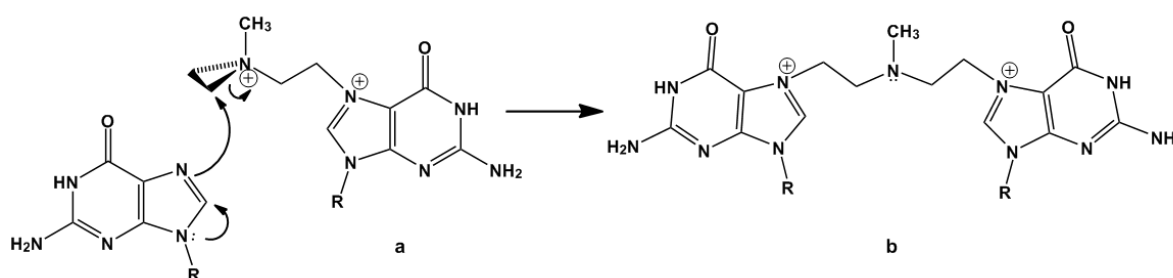
Daljnjim proučavanjem reakcije metodama molekularnog modeliranja utvrđena je idealna udaljenost od 5,1 Å dva atoma dušika gvanozina (N^7 i N^7), s različitih lanaca DNA, na $5'\text{GpC}^{3'}$ sekvenci, preko kojih se uz pomoć mekloretamina ostvaruje interlančano križno povezivanje (shema 11).¹⁰

Prvi korak u reakcijskom mehanizmu alkiliranja dušične baze DNA iperitom je formiranje aziridinijevog iona (sh. 10,b), koji vrlo brzo reagira s bazom DNA (sh. 10,d) pri čemu nastaje monoaddukt (sh. 10,c).¹⁰



Shema 10. Nastajanje monoaddukta, koje se još naziva monomerna aktivacija¹⁰

Nastavak reakcije vodi ka stvaranju novog aziridinijevog iona na monoaduktu (sh. 11,**a**) te reakcijom s još jednim gvaninskim ostatkom, što dovodi do nastanka bisalkiliranog produkta (sh.11,**b**), odnosno N^7 - N^7 interlančano križno povezane DNA. Mogućnost nastanka intralančano ili interhelikalno križno povezane DNA nije isključena, no upravo idealna udaljenost od 5,1 Å upućuje na nastanak interlančano križno povezane DNA.

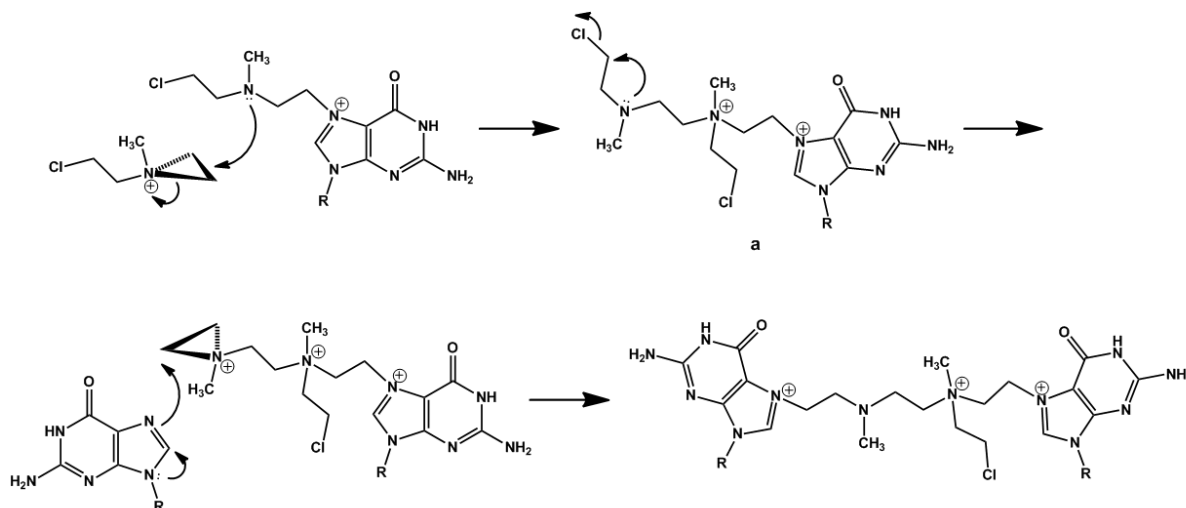


Shema 11. N^7 - N^7 interlančano križno povezana DNA¹⁰

Kao što se vidi na slici 6, intralančano križno povezivanje (engl. *intrastrand cross link*) je povezivanje lanca unutar iste molekule DNA preko alkilacijskog agensa. Takva vrsta povezivanja molekule DNA i alkilacijskog agensa je moguća, no nije i zabilježena.¹¹ Interlančano križno povezivanje (engl. *interstrand cross link*) je povezivanje dvaju antiparalelnih lanaca unutar iste molekule DNA uz pomoć alkilacijskog agensa kao što su iperiti.¹⁰

Da bi se molekula DNA replicirala, tj. stvorila vlastitu kopiju, lanci se moraju razdvojiti. Na tako razdvojenim lancima dolazi do replikacije i u stanici-kćeri će novonastala DNA zavojnica imati jedan originalni lanac, a komplementarni lanac će biti prepisani lanac. Ukoliko se lanci ne mogu razdvojiti u replikaciji, što je slučaj ako su povezani interlančano, stanični ciklus se prekida i stanica umire jer je nemoguć nastavak replikacije. Na tome se temelji djelovanje dušikovih iperita kao lijekova. Stanice raka puno se brže umnožavaju od zdravih stanica pa će dušikov iperit njima napraviti puno veću štetu nego zdravim stanicama.

Postoji i mogućnost dimerizacije iperitnog dijela interlančano križno povezane DNA, kao što je prikazano na shemi 12.¹⁰



Shema 12. Nastanak N7-N7 interlančanog križno povezanog dimera¹⁰

Nastanak međuprodukta (sh. 12,a) moguć je zbog toga što je aaminski dušik iperita dobar nukleofil.

2.3. Biološka aktivnost iperitâ

2.3.1. Sumporovi iperiti kao bojni otrovi

Prva upotreba sumporovih iperita kao kemijskog oružja zbila se tokom Prvog svjetskog rata, u srpnju 1917. godine, na bojnopolju u blizini belgijskog gradića Ypresa. Sumporov iperit pokazao se vrlo učinkovitim kemijskim oružjem u periodu korištenja od tri tjedna (1917. godine) prouzročivši 14 278 žrtava. U počecima njegove upotrebe, poznavanje simptoma i načini liječenja nakon trovanja otrovom takve vrste bila je iznimno mala. Upravo zbog tog razloga, sumporov iperit prouzročio je, u Prvom svjetskom ratu, 1 205 655 nefatalnih slučajeva i 91 198 smrtnih slučajeva. Na konferenciji u Washingtonu 1921. godine te u Genevi 1925. godine, donesena je odluka o zabrani korištenja kemijskog oružja, no kako je kemijsko oružje intenzivno korišteno u mnogim sukobima narednih godina, očito je da donesena odluka nije imala ozbiljno značenje. Zanimljivo je kako se otrovni plinovi nisu koristili za vrijeme Drugog svjetskog rata na području Europe i Pacifičkih otoka (izuzevši napad na Bari, 2.prosinca 1943.godine).¹²

U usporedbi s ostalim bojnim otrovima, sumporov iperit ima nisku letalnu toksičnost. Stupanj smrtnosti vojnika izloženih utjecaju sumporovog iperita u Prvom svjetskom ratu iznosio je oko 2 %, a u Iransko-Iračkom ratu oko 4 %. "Primarna zadaća" sumporovih iperita nije ubijanje, već on služi kao odličan agens za onesposobljavanje. Mjera koja to pokazuje je srednja letalna doza (engl. *median lethal dose*, LD₅₀). Vrijednost LD₅₀ pokazuje količinu određene tvari, kojom su tretirani ispitanici u skupini, dovoljnom da ubije 50 % ispitanika. Kod čovjeka LD₅₀ za sumporov iperit iznosi između 200 mg/kg (oralno) i 4-5 g kg⁻¹ (apsorbirano preko kože). Respiratorna letalna doza iznosi oko 1500 mg min⁻¹m⁻³.¹³

Opsežna istraživanja provedena su na vojnicima koji su bili izloženi utjecaju sumporovog iperita tijekom Iransko-iračkog rata u periodu između 1983. i 1988. godine. Najčešći načini apsorpcije sumporova iperita su: udisanjem, kroz kožu i kroz prednje dijelove oka. Također, nerijetki način trovanja iperitom bio je preko kontaminirane vode i/ili hrane. Izloženost sumporovom iperitu utječe na različite organe, kao što su koža, oči i pluća, no svakako je nezanemariv utjecaj na hematološki, imunološki, endokrini, neurološki i mišićni sustav. Toksični utjecaji sumporova iperita mogu se podijeliti u dvije skupine: početni efekti i dugoročni efekti. U slučaju početnih efekata, akutni oblici javljaju se nakon različitog vremenskog razdoblja, što ovisi o koncentraciji iperita, vrsti apsorpcije, temperaturi okoline, korištenju zaštitne opreme i o samom pojedincu. Najosjetljiviji organ na izloženost sumporovom iperitu su oči. Prvi klinički simptomi (iritacije, žestoka bol, krvave oči, nakupina tekućine i blagi konjuktivitis) pojavljuju se oko 1 sat nakon izloženosti. 2-6 sati nakon trovanja javlja se fotofobija, suzenje, čak i privremena sljepoća. Koncentracije manje od 50 mg m⁻³ min⁻¹ rezultiraju konjuktivitisom, a koncentracije iznad 200 mg min⁻¹ m⁻³ rezultiraju oticanjem rožnice i nakupljanjem tekućine. Nakon nekoliko sati, na području rožnice javljaju se plikovi, što smanjuje oštrinu vida. Pri višim koncentracijama velika je mogućnost trajne sljepoće. Oporavak može trajati do 6 tjedana. Zbog svoje velike površine i izloženosti, koža je vrlo često na meti iperita. Eritrem (crvenilo, infektivna akutna bolest kože) popraćen plikovima, karakteristična je pojava koja se javlja nakon izlaganja kože sumporovom iperitu. Simptomi eritrema (svrbež) javljaju se 2-24 sata nakon kontakta s otrovom. Plikovi se javljaju nakon 18 sati, u formi manjih mjehurića, no kasnije prelaze u velike mjehure ispunjene žutom tekućinom. Sami po sebi, plikovi nisu bolni, ali stvaraju osjećaj nelagode. Nakon 2 dana pojavljuju se novi plikovi, a prvotni pucaju ostavljajući ožiljak. Prilikom ozbiljnijeg izlaganja kože iperitu, plikovi ostaju i do 3 tjedna, dok svrbež

prestaje tek nakon 12 tjedana. Zanimljivo je kako se opekline nastale sumporovim iperitom duže i teže liječi nego toplinska opekline. Također, govoreći o početnim efektima, valja spomenuti i utjecaj na koštano srž, gastrointestinalne učinke, oštećenja živčanog sustava i sl. Što se pak dugoročnih efekata tiče, 2-28 mjeseci nakon izlaganja sumporovom iperitu najveće posljedice zabilježene su na respiratornom traktu, koži i očima. U opsežnom istraživanju provedenom na 34 000 Iranskih veterana, 13-20 godina nakon trovanja sumporovim iperitom, najveća oštećenja pronađena su na plućima (kronične opstruktivne plućne bolesti, bronhitis, astma), očima (oštećenja vida i sljepoća) i koži (hiperpigmentacija, hipopigmentacija, osip, svrbež, ožiljci). Povećano izlaganje sumporovom iperitu također ostavlja trajne posljedice na imunološki i reproduktivni sustav. Zbog pojave povećanog udjela karcinoma pluća kod Iranskih veterana, sumporov iperit svrstan je u skupinu kancerogenih spojeva. Uspoređujući početne i dugoročne utjecaje uočljivo je kako se problemi u respiratornom dijelu pogoršavaju tijekom godina, dok se većina bolesti i oštećenja na koži i očima smanjuju tijekom vremena. Izuzetak je primjerice keratitis (upala rožnice oka) koji se pojavljuje čak i nakon 15-20 godina nakon izlaganja sumporovom iperitu.¹⁴

2.3.2. Dušikovi iperiti kao kemoterapeutici

Uslijed intenzivne upotrebe sumporovih iperita u svrhu ubijanja ljudi tijekom Prvog svjetskog rata, E. B. Krumbhaar (kapetan američkog medicinskog korpusa tijekom Prvog svjetskog rata) je 1919. godine opazio zanimljiv utjecaj sumporovih iperita na vojnike koji su bili zahvaćeni tim agensom. Dotadašnja klinička istraživanja upućivala su na leukocitozu (povećan udio leukocita u krvi), no Krumbhaar je uočio razvoj leukopenije (smanjen udio leukocita) kod pojedinaca koji su preživjeli nekoliko dana nakon trovanja iperitom. Takvo je opažanje dalo naslutiti mogućnost korištenja sumporovih iperita u kliničke svrhe za liječenje limfoma. U to doba, bio je to vjerojatno jedini koristan podatak nakon silnih žrtava i napada otrovnim iperitom. Činjenica da iperit posjeduje potencijalne terapijske mogućnosti, potaknula su istraživanja i razvoj takvih spojeva i nakon Prvog svjetskog rata. Američki ured za znanstvena istraživanja i razvoj, na čijem čelu je bio Vannevar Bush, vodio je program o ratovanju kemijskim oružjem. Ta grupa nastavila je istraživanja na sveučilištu Yale, u skladu s Krumbhaarovim opažanjima o leukopeniji, te su pokazali značajno smanjenje limfoma na eksperimentalnim životinjama nakon davanja dušikovog iperita. Prvo liječenje čovjeka dušikovim iperitom zbilo se u prosincu 1942. godine. Američki liječnik Gustaf Lindskog

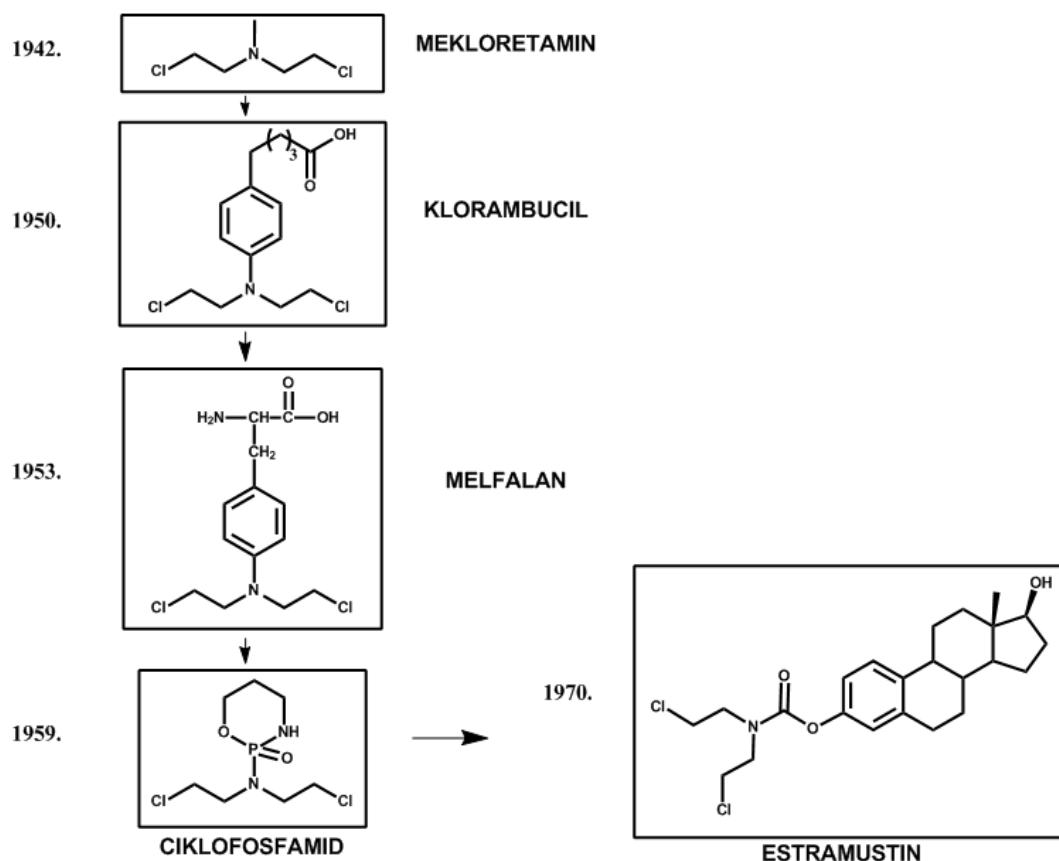
(1903.-2002.) odabrao je 48-godišnjaka oboljelog od neizlječivog limfoma kao prvu osobu kojoj je intravenozno dano 10 doza po 0,1-1,0 mg kg⁻¹ dušikovog iperita – mekloretamina. Na svačije oduševljenje, limfom je nestao. Bio je to početak korištenja kemoterapije kao tretmana za liječenje malignih bolesti. Navedeno eksperimentalno liječenje čuvano je u tajnosti sve do 1946. godine. Iste godine, Goodman i suradnici (tada vodeći u području farmakologije i hematologije) opisuju kako su se i oni, u ratno vrijeme, udružili u istraživanja o utjecajima iperita na limfome. Zapanjujuća otkrića prvotno nisu objavljena zbog čuvanja tajnosti tijekom Drugog svjetskog rata. Metode pokušaja liječenja raka prije kemoterapije bile su operativni zahvati i zračenja (terapija radijacijom). Objava revolucionarnog otkrića bila je poticaj za daljnja istraživanja i terapijske mogućnosti upotrebom iperita.¹²

Zainteresiranost prema istraživanju dušikovitih iperita - potencijalnog lijeka protiv tumora, bila je velika. Provodili su se mnogi eksperimenti na životinjama (najčešće miševima i zečevima). Rezultati su i dalje bili zapanjujući. Pojednim miševima, oboljelim od raka, životni vijek se nakon tretmana dušikovim iperitom produžio za osamdeset dana. Taj podatak bio je znak da su dušikovi iperiti vrlo učinkoviti u liječenju nekih vrsta karcinoma jer je dotadašnji najbolji rezultat u produžetku životnog vijeka neke od životinja bio četrdeset dana. Terapije dušikovim iperitima nastavile su se i na ljudima, no prvi problem pojavio se kada je uočena otpornost određene vrste karcinoma prema iperitu. Bila je to naznaka ograničenosti djelovanja takvih vrsta spojeva prema karcinomima. Sljedeći problem bila je specifičnost iperita prema stanicama raka, odnosno mogućnost da uništi stanice raka prije nego što uništi stanice domaćina, tj. zdrave stanice. Pošto stanice raka i normalne zdrave stanice dijele istu DNA i glavne metaboličke puteve, velik broj kemoterapeutika koji djeluju na stanice raka isto tako mogu djelovati i na zdrave stanice, što može prouzročiti štetne utecaje.¹⁵ Konkretni problem aktualan je i u današnjem suvremenom svijetu te predstavlja najveću prepreku u pronalasku novih lijekova za rak.¹⁶

2.4. Kliničke primjene dušikovitih iperita

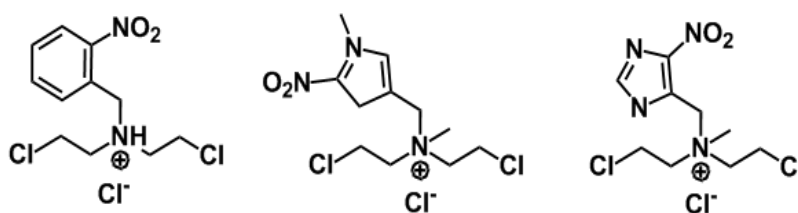
Od prve terapije dušikovim iperitom 1942. godine, kada su se zbog svoje visoke reaktivnosti i toksičnosti iperiti pokazali kao potencijalni antitumorski reagensi, pa do današnjeg vremena, sintetiziran je velik broj dušikovitih iperita koji posjeduju različite preinake u strukturi. Svi ti novonastali spojevi napravljeni su s jednim ciljem, a to je specifična doprema lijeka (dušikovog iperita) do stanice tumora pokušavajući pritom što manje oštetiti zdrave stanice.

Više od 70 godina istraživanja dušikovih iperita pridonijelo je razvoju mnogih spojeva koji se i danas koriste u terapijske svrhe. Neke od najvažnijih struktura, s kratkim povijesnim pregledom, prikazane su na slici 7. Jedan od načina dizajniranja spojeva koji se mogu primjenjivati oralno je smanjenje elektrofilnosti dušikovih iperita, čime se dobivaju sigurniji analozi. Takav pristup primijenjen je na razvoju nekih od klinički važnih antitumorskih lijekova kao što su mekloreタミン, klorambucil, melfalan, ciklofosfamid i estramustin.

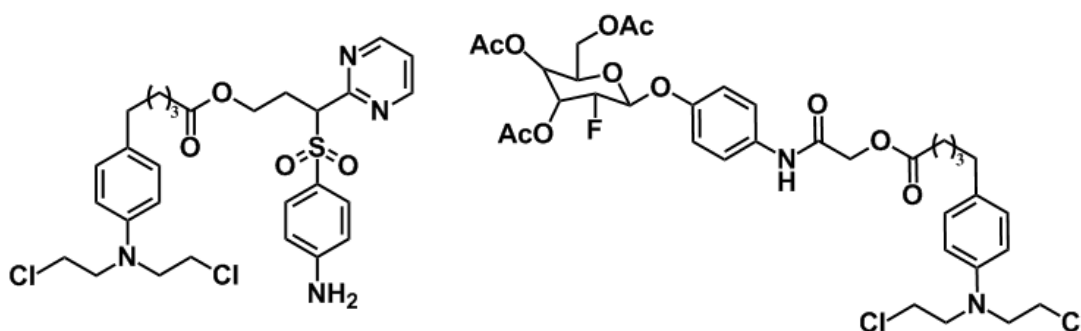


Slika 7. Povijesni razvoj iperita¹⁷

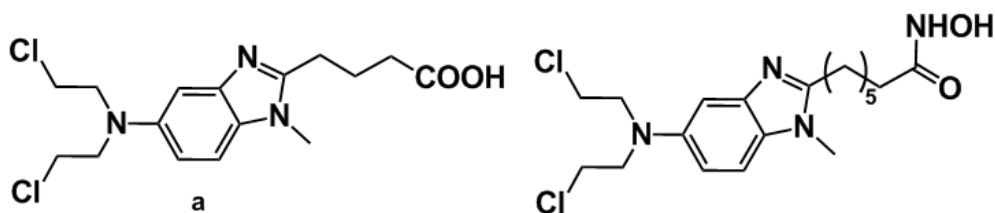
Mekloreタミン (klormetin) prvi je od derivata dušikovih iperita korištenih u kemoterapijske svrhe. Koristi se u liječenju Hodgkinovog limfoma, kroničnog T-staničnog limfoma i ostalih vrsta limfoma, no negativno djeluje na koštanu srž. U stanicama tumora uočeno je stanje hipoksije (niske koncentracije kisika), što može poslužiti kao dobar alat za selektivnost prema tumorskim stanicama, odnosno u pripravi lijekova koji su toksični samo za takvu vrstu stanica ili se pak aktiviraju u takvim uvjetima (slika 8).

Slika 8. Neki analozi mefloretamina¹⁷

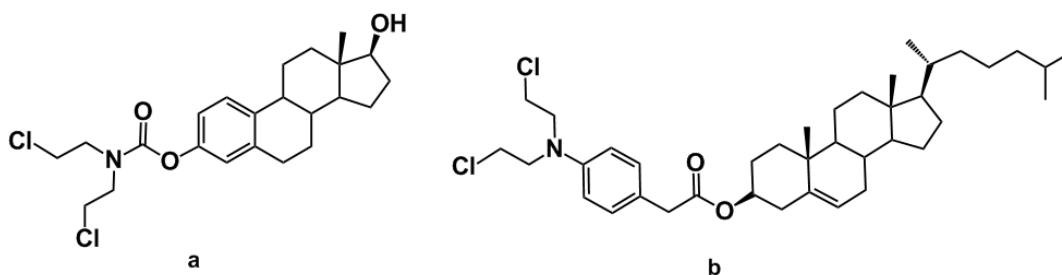
Klorambucil se koristi u liječenju kronične limfocitne leukemije, limfoma te karcinoma jajnika. Korištenje klorambucila u terapijske svrhe strogo je ograničeno zbog toksičnog utjecaja i mogućih negativnih utjecaja na koštanu srž, imunološki sustav i pojavu anemije. Jedan od načina kako spriječiti dopremu antitumorskih lijekova do zdravih stanica je vezanjem takvih tvari na pogodan (proteinski) nosač te dostava u tom obliku u tumorske stanice (slika 9).

Slika 9. Neki analozi klorambucila¹⁷

Zamjenom benzenskog prstena klorambucila s *N*-metilbenzimidazolom nastaje snažniji i sigurniji antitumorski agens, bendamustin (sl. 10,a). Bendamustin je koristan lijek u liječenju tumora središnjeg živčanog sustava. Zbog svoje slabe sposobnosti u terapiji, sintetizirani su mnogi derivati bendamustina u svrhu postizanja bolje antitumorske aktivnosti.



Konjugati alkilacijskih reagensa (dušikovog iperita) sa steroidnom jezgrom novija su vrsta antitumorskih lijekova. Estramustin (sl. 13,**a**) i fenestrin (sl. 13,**b**) napravljeni su u svrhu specifične terapije liječenja tumora dojke. Steroidna jezgra u strukturi iperita ima ulogu pojačavanja afiniteta za nastanak kovalentno vezanih adukata s molekulom DNA u stanicama tumora, s dodatnom sposobnošću blokiranja obnavljajućih enzima na način da ih se kamuflira.¹⁸



Slika 13. Steroidni analozi dušikovog iperita¹⁸

2.5. Zaključak

Na primjeru iperita valja uočiti kako su se iz spojeva prvotno namijenjenih za uništavanje ljudskih života izrodili spojevi koji pomažu u njihovom spašavanju. Upotreba sumporovih iperita u ratne svrhe zabranjena je raznim konvencijama te se oni danas više ne koriste. Korištenje dušikovitih iperita kao kemoterapeutika smanjilo se od početka njihove upotrebe zbog pronalaska drugih učinkovitijih spojeva s manje nuspojava, no u određenoj mjeri koriste se i danas. Svejedno, i dalje se razvijaju novi derivati dušikovitih iperita koji bi mogli pomoći u borbi s vodećim uzročnikom smrtnosti današnjice.

§ 3. LITERATURNI IZVORI

1. R. J. Duchovich, J. A. Vilensky, *J. Chem. Educ.* **84** (2007) 944-948.
2. K. E. Jackson, *Chem. Rev.* **15** (1934) 425-462.
3. R.N. Saladi, E. Smith, A. N. Persaud, *Clin. Exp. Dermatol.* **31** (2005) 1-5.
4. M. F. Sartori, *Chem. Rev.* **48** (1951) 225-257.
5. J. B. Sweeney, *Chem. Soc. Rev.* **31** (2002) 247-258.
6. J. Clayden, N. Greeves, S. Warren, P. Wothers, *Organic Chemistry* (1st ed.), Oxford University Press, 2001, str. a) 970-973, b) 1124-1126, c) 1134-1136.
7. Q. Q. Wang, R. A. Begum, V. W. Day, K. Bowman-James, *Org. Biomol. Chem.* **10** (2012) 8786-8793.
8. P. Pande, J. Shearer, J. Yang, W. Greenbern, S. E. Rokita, *J. Am. Chem. Soc.* **121** (1999) 6773-6779.
9. W. E. Handby, H. N. Rydon, *J. Chem. Soc.* (1947) 513-519.
10. S. R. Rajski, R. M. Williams, *Chem. Rev.* **98** (1998) 2723-2795.
11. G. B. Bauer, L. F. Povirk, *Nucleic Acids Res.* **25** (1997) 1211-1218.
12. J. Hirsch, *JAMA* **296** (2006) 1518-1520.
13. M. Balali-Mood, M. Hefazi, *Arch. Iranian Med.* **8** (2005) 162-179.
14. M. Balali-Mood, M. Hefazi, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **99** (2006) 273-282.
15. D. Shewach, *Chem. Rev.* **109** (2009) 2859-2861.
16. A. Gilmann, *Am. J. Surg.* **105** (1963) 574-578.
17. R. K. Singh, S. Kumar, D. N. Prasad, T. R. Bhardwaj, *Eur. J. Med. Chem.* **151** (2018) 401-433.
18. R. Bansal, P. C. Acharya, *Chem. Rev.* **114**, 6986-7005.